

日本国特許庁 30.07.98

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 21 SEP 1998

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1997年 7月31日

出願番号
Application Number:

平成 9年特許願第206602号

出願人
Applicant(s):

理化学研究所

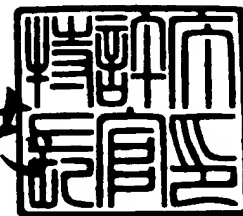
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1998年 9月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平10-3069696

【書類名】 特許願

【整理番号】 97211H

【提出日】 平成 9年 7月31日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 塩基配列中の変異を検出する方法

【請求項の数】 30

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市高野台3丁目1番1 理化学研究所ライ
フサイエンス筑波研究センター内

【氏名】 林崎 良英

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【氏名又は名称】 理化学研究所

【代表者】 有馬 朗人

【代理人】

【識別番号】 100092635

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100096219

【弁理士】

【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

【識別番号】 100095843

【弁理士】

【氏名又は名称】 釜田 淳爾

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 007663

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9607613

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 塩基配列中の変異を検出する方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (A) 1種または2種以上の核酸断片及び1種または2種以上のPNA断片からなる群から選ばれる1種または2種以上の断片を固定した基板上の前記断片の少なくとも1つと、1種または2種以上の核酸断片及び1種または2種以上のPNA断片からなる群から選ばれる少なくとも1種の変異を検定すべき断片とをハイブリダイズさせる工程、

(B) ハイブリダイズした断片間に生じた不適正塩基対に、不適正塩基対に特異的に結合する物質であって、標識された物質を結合させる工程、

(C) 前記物質が結合した断片を、前記標識を検出することにより同定する工程を含む、変異を有する核酸及び／又はPNA断片を検出する方法。

【請求項2】 不適正塩基対に特異的に結合する物質が、ミスマッチ結合タンパク質である請求項1記載の方法。

【請求項3】 ミスマッチ結合タンパク質がMut Sまたはその類似体である請求項2記載の方法。

【請求項4】 不適正塩基対に特異的に結合する物質が、発光タンパク質、リン光タンパク質、蛍光タンパク質、発光物質、蛍光物質、リン光物質、放射性物質、安定同位元素、抗体、抗原、酵素及びタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも1種の物質で標識されている請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 不適正塩基対に特異的に結合する物質が、GFP (Green Fluorescence Protein)で標識されている請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片が標識されており、かつ変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片の標識を検出することにより、不適正塩基対を生じた断片の同定と定量とを行う請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片に導入された標識が、不適正塩基対に特異的に結合する物質の標識とは、得られるシグナルが異なり、不適正塩基対を生じた断片の同定と定量とを並行して行う請求項6に記載の

方法。

【請求項 8】 変異を検定すべき核酸及び／又は PNA が、発光物質、蛍光物質、リン光物質、安定同位元素、放射性物質、抗体、抗原、酵素及びタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の物質で標識されている請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】 (A) 1 種または 2 種以上の核酸断片及び 1 種または 2 種以上の PNA 断片からなる群から選ばれる 1 種または 2 種以上の断片を固定した基板上の前記断片の少なくとも 1 つと、1 種または 2 種以上の核酸断片及び 1 種または 2 種以上の PNA 断片からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の変異を検定すべき断片とをハイブリダイズさせる工程、

(D) ハイブリダイズした断片間に生じた不適正塩基対に、不適正塩基対を特異的に認識切断する物質を作用させて、不適正塩基対を起点としてハイブリッドした断片を切断するか、または不適正塩基対を起点としてハイブリッドした断片の一方の断片の少なくとも一部を切除する工程、

(E) 切断または切除後に基板上に残った断片を標識する工程、

(F) 標識された断片を、前記標識を検出することにより同定する工程

を含む、変異を有する核酸及び／又は PNA 断片を検出する方法。

【請求項 10】 基板上に固定された断片の 3 末端がブロックされており、かつ工程 (E) における断片の標識を 3 付加反応により行う請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】 不適正塩基対を特異的に認識切断する物質が、ヌクレアーゼである請求項 9 または 10 記載の方法。

【請求項 12】 ヌクレアーゼが、S1 ヌクレアーゼ、マングビーン (Mung bean) ヌクレアーゼまたは RNase H である請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】 工程 (E) における、断片の標識を、標識された基質を用いた酵素反応により行う請求項 9 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】 酵素反応がポリメラーゼ反応、カイネーション反応、ライゲーション反応、または 3 付加反応である請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】 基質が、発光物質、蛍光物質、リン光物質、安定同位元素、放射性物質、抗体、抗原、酵素及びタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも

1種の物質で標識されている請求項13または14に記載の方法。

【請求項16】 変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片が標識されており、かつ変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片の標識を検出することにより、不適正塩基対を生じた断片の同定と定量とを行う請求項9～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】 変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片に導入された標識が、工程(E)において断片に付与される標識とは、得られるシグナルが異なり、不適正塩基対を生じた断片の同定と定量とを並行して行う請求項16に記載の方法。

【請求項18】 変異を検定すべき核酸及び／又はPNAが、発光物質、蛍光物質、リン光物質、安定同位元素、放射性物質、抗体、抗原、酵素及びタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも1種の物質で標識されている請求項16または17に記載の方法。

【請求項19】 基板に固定された核酸またはPNAの断片は、その5'または3'端においてのみ結合している請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】 基板に固定された核酸またはPNA断片が共有結合により基板に固定している請求項1～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】 基板上に固定した核酸またはPNAの断片が、cDNAの配列を有する断片である請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】 基板上に固定した核酸またはPNAの断片が、遺伝子完全長のcDNAの一部または全部の配列を有する請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】 不適正塩基対に特異的に結合する物質であって、標識されていることを特徴とする物質。

【請求項24】 不適正塩基対に特異的に結合する物質が、ミスマッチ結合タンパク質である請求項23記載の物質。

【請求項25】 ミスマッチ結合タンパク質がMut Sまたはその類似体である請求項24記載の物質。

【請求項26】 標識が、GFP(Green Fluorescence Protein)で標識されている

る請求項23～25のいずれか1項に記載の物質。

【請求項27】 標識が、発光タンパク質、リン光タンパク質、蛍光タンパク質、発光物質、蛍光物質、リン光物質、安定同位元素、放射性物質、抗体、抗原、酵素及びタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも1種の物質である請求項21～26のいずれか1項に記載の物質。

【請求項28】 基板の表面に1種又は2種以上のRNA断片又はPNA断片をハイブリダイゼーション可能な状態で固定したことを特徴とする物品。

【請求項29】 基板に固定されたRNA断片又はPNA断片は、その5'端又は3'端においてのみ基板と結合している請求項28に記載の物品。

【請求項30】 基板に固定されたRNA断片又はPNA断片が共有結合により基板に固定している請求項28または29に記載の物品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、不適正塩基対を検出することによる塩基配列中に存在する変異（塩基置換）を検出する方法に関する。さらに本発明は、塩基配列中に存在する変異を検出すると同時に変異を有する遺伝子の発現量も検出できる方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

医学生物学の分野において、遺伝子の発現量及びその変異について検出する手法は、未知の遺伝子同定や疾病の診断に非常によく使われている重要な手法である。この発現遺伝子を検出する手法は2種に大別できる。1つはcDNAの視覚化の方法であり、他の1つは既にゲノム解析で単離されたcDNAを基板上にはりつけ、ハイブリダイゼーションによって検出するマイクロアレイの手法である。

まず第1のグループであるcDNAの視覚化手法であるが、Differential display法(Liang, P. and Pardee, A. Science 257, 967-971)、分子索引法(molecular indexing (Bernner, S. and Livak, K. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8902-8906))、RLGS(restriction landmark cDNA scanning(Hatada, I. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 9523-9527))のような方法が報告されてい

る。これらの方法は、電気泳動によりDNA断片を分離検出している為、その際SSC P法(Orita, M., Suzuki, Y., Seikiya, T., Hayashi, K. Genomics 5, 874-879)、DGGE法(Myers, R. M. et al. Method Enzymol. 155, 501-517)等を用いて、DNA断片上の塩基置換を検出することができる。すなわちDNAの多型を検出し、連鎖解析法や突然変異の直接的検出に用いることができる。

【0003】

一方、最近の急速なゲノム科学の進歩により、発生段階を含め、全てのステージ及び全ての組織でcDNA (EST) が大量に単離され、塩基配列が決定されている。また、最近では完全長cDNAライブラリーを用いた遺伝子全長の構造が決定されつつあり、それがデータバンクとクローンバンクという形で蓄積されつつある。このcDNAプロジェクトから得られた大量のクローンを用いる、cDNAマイクロアレイエクスプレッションモニタリング(hena, M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 10614-10619)という手法が報告されている。この手法では、上記クローンに該当する遺伝子の発現を、cDNAを固定した基板に検体から取られたmRNAの逆転写酵素を用いて、逆転写する際、標識を入れそれをプローブとして用いてハイブリダイズすることで、検出する。この方法は、単離されたcDNA (EST) 全てについて、アッセイが可能であり、ゲノム情報及びゲノムバンクが蓄積すればするほど、既に単離されたDNA断片(cDNA (EST)) 全てについて測定することができる。また、PCRに依存しない手法である為、シグナル強度が全て遺伝子の発現量を示す。

【0004】

【発明が解決すべき課題】

上記に上げた2つのグループの手法のうち、cDNAの視覚化手法には次のような欠点がある。これらの方法で視覚化されたシグナルがどの遺伝子であるかという情報が整備されておらず、興味あるシグナルを検出した後、そのシグナルからそれに該当するDNA断片を単離回収しなくてはならない。また、発現している遺伝子をどの程度まで検出できるかという感度は、各々の手法の原理に依存している。特にDifferential display法や分子索引法(Molecular indexing)のようにPCRを用いている場合は、感度は良いが、発現量の検出にPCRのバイアスがかかり、

発現量の少ない配列についてはオミットされる場合があり、正確な発現量をモニターすることができない。一方、RLCS法のようなPCRを用いない手法では、シグナルの強さが発現量をモニターしてはいるが、感度が悪く全ての遺伝子をシグナルとして検出しているとは言い難い。

一方、マイクロアレーハイブリダイゼーション法に関しては、ハイブリダイゼーションによりシグナルを検出している為に、点変異などの小さな塩基配列の相違を検出することができないという欠点がある。

【0005】

そこで本発明の目的は、蓄積されつつあるゲノム情報、ゲノムクローンの資源を利用して、複数の遺伝子の構造変異を並行して検出可能な方法、特に、発現量を同時にモニターしながら、その構造変異を検出可能な方法を提供することにある。発現量のモニターとその構造変異（塩基置換）を同時に検出することが可能であることにより、既知のゲノム情報を利用して、どの遺伝子に構造変異（塩基置換）が起きているかを迅速に判定することが出来る。

さらに本発明の目的は、上記方法に使用するための試薬及び装置を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明は、（A）1種または2種以上の核酸断片及び1種または2種以上のPNA断片からなる群から選ばれる1種または2種以上の断片を固定した基板上的前記断片の少なくとも1つと、1種または2種以上の核酸断片及び1種または2種以上のPNA断片からなる群から選ばれる少なくとも1種の変異を検定すべき断片とをハイブリダイズさせる工程、

（B）ハイブリダイズした断片間に生じた不適正塩基対に、不適正塩基対に特異的に結合する物質であって、標識された物質を結合させる工程、

（C）前記物質が結合した断片を、前記標識を検出することにより同定する工程を含む、変異を有する核酸及び／又はPNA断片を検出する方法。

（以下第1の検出方法という）に関する。

【0007】

さらに本発明は、(A) 1種または2種以上の核酸断片及び1種または2種以上のPNA断片からなる群から選ばれる1種または2種以上の断片を固定した基板の前記断片の少なくとも1つと、1種または2種以上の核酸断片及び1種または2種以上のPNA断片からなる群から選ばれる少なくとも1種の変異を検定すべき断片とをハイブリダイズさせる工程、

(D) ハイブリダイズした断片間に生じた不適正塩基対に、不適正塩基対を特異的に認識切断する物質を作用させて、不適正塩基対を起点としてハイブリッドした断片を切断するか、または不適正塩基対を起点としてハイブリッドした断片の一方の断片の少なくとも一部を切除する工程、

(E) 切断または切除後に基板上に残った断片を標識する工程、

(F) 標識された断片を、前記標識を検出することにより同定する工程
を含む、変異を有する核酸及び／又はPNA断片を検出する方法。

(以下第2の検出方法という)に関する。

加えて本発明は、不適正塩基対に特異的に結合する物質であって、標識されていることを特徴とする物質に関する。

また、本発明は、基板の表面に1種又は2種以上のRNA断片又はPNA断片をハイブリダイゼーション可能な状態で固定したことを特徴とする物品に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】

以下本発明について説明する。

工程(A)

本発明の第一及び第2の検出方法ともに、「1種または2種以上の核酸断片及び1種または2種以上のPNA断片からなる群から選ばれる1種または2種以上の断片を固定した基板」を用いる。上記核酸断片とは、DNA断片及びRNA断片を含み、基板に固定される断片は、単一(1本)の核酸断片または単一(1本)のPNA断片であることができる。また、複数本の核酸断片及び／又はPNA断片が基板に固定されいてもよく、その場合、基板に固定される断片は、配列及び／又は鎖長の異なる2種以上のDNA断片、RNA断片又はPNA断片であることができる。

さらに、基板には、DNA断片及びRNA断片、DNA断片及びPNA断片、RNA断片及びPNA

断片またはDNA断片、RNA断片及びPNA断片が混在していてもよく、その場合、各断片は、配列及び／又は鎖長の異なる断片であることができる。

基板に固定されるDNA断片、RNA断片及びPNA断片等の断片は、塩基配列を持つ、高分子であるならば特に制限はない。また、目的とするDNAが遺伝子の転写体であるcDNAであっても、ゲノムDNAであっても特に制限はない。遺伝子完全長のcDNAの一部または全部の配列を有するDNA断片であっても良い。DNA断片を基板上に固定したものは、例えば、DNAチップとして知られている。

cDNAを固定したマイクロアレーチップ及びこれを用いた転写産物発現量の測定法は公知である。本発明の方法は、マイクロアレーチップによる転写産物発現量の測定方法では検出できない不適正塩基対の発現量を、同時に回収することに特徴がある。後述のように、転写産物発現量を計測するシグナルと異なったシグナルで不適正塩基対の発現量を計測することにより、相方の情報を同時に回収することができる。

【0009】

基板に固定される核酸材料としては、より具体的には、例えば、完全長cDNAやEST (cDNA) またゲノムDNA等を挙げることができ、これらは、公知の方法を用いて調製することができる。ゲノムDNAとしてプラスミド、ファージ、PAC、BAC、YAC等を挙げることができる。

上記完全長cDNAやEST (cDNA) またゲノムDNA等は、公知の方法で切り出し、基板上に固定することができる。特に基板への固定は、DNA断片の5'末端3'末端[等の一点により基板と結合し、塩基配列の部分が固定されないようにすることが好ましい。ハイブリダイズした全長の部分が基板から離れているため検出しやすいという利点がある。具体的なDNAの基板上への固定方法は、例えば、共有結合させることが好ましいが、必ずしも固定方法に制限はない。

基板の表面に1種又は2種以上のRNA断片又はPNA断片をハイブリダイゼーション可能な状態で固定した物品はこれまで知られておらず、本発明はこれらの物品を包含する。前記RNA断片又はPNA断片は、その5'末端又は3'末端[においてのみ基板と結合することで基板に固定され、その結果、ハイブリダイゼーション可能な状態で固定される。また、断片の基板に固定は、例えば、RNA断片又はPNA断片の末端

を、必要により化学修飾し、基板上に存在する水酸基等の反応性基と反応させることで、共有結合させることで行うことができる。基板となるものの材質や寸法には特に制限はなく、操作の簡便性等を考慮してチップ状やフィルター状とすることができる。

本発明の方法では、1つの基板に、配列が既知の複数の核酸断片及び／又はPNA断片を複数個固定しておくことで、配列の異なる核酸断片及び／又はPNA断片について同時に（並行して）変異を検出することができるという利点がある。固定する断片の個数には特に制限はない。

【0010】

一方、変異を検定すべき断片は、1種または2種以上の核酸断片及び1種または2種以上のPNA断片からなる群から選ばれる少なくとも1種である。変異を検定すべき断片についても、基板に固定される断片と同様に、単一（1本）の核酸断片または単一（1本）のPNA断片であることができる。また、複数本の核酸断片及び／又はPNA断片であってもよく、その場合、変異を検定すべき断片は、配列及び／又は鎖長の異なる2種以上のDNA断片、RNA断片又はPNA断片であることができる。さらに、DNA断片及びRNA断片、DNA断片及びPNA断片、RNA断片及びPNA断片またはDNA断片、RNA断片及びPNA断片が混在していてもよく、その場合、各断片は、配列及び／又は鎖長の異なる断片であることができる。

これら変異を検定すべき断片（プローブ）は、例えば、遺伝子転写産物であるcDNA、ゲノムDNA、生態内に存在するmRNA、生体外転写（*in vitro* transcription）されたRNA及び／又はPNAであることができる。但し、これらち限定されない。

例えば、変異と発現量を検出すべき断片がcDNA断片である場合、目的の発現時期、発現組織からmRNAを単離し、第1鎖完全長cDNAを合成する方法によりこのcDNAの第1鎖に標識を入れることができる。ハイブリダイズさせる断片の標識は、後述のように蛍光、リン光、発光、安定同位元素、放射性物質等を用いることができる。但し、以下に述べる不適正塩基対認識物質と異なる標識物質、方法を取ることが、発現量と不適正塩基対量の比を同時に検出できるので望ましい。標識されたプローブを調製し、核酸を固定した基盤に反応させハイブリダイズ分子を作る。標識は、蛍光物質（ローダミン系またはフルオレセン系）で行ってもよい

し、また³²P、³⁵Sの様な放射性同位元素を用いて、既知の方法により標識してもよい。

基板に固定された断片と変異を検定すべき断片とのハイブリダイズは、常法により行うことができる。

【0011】

工程(B)

本発明の第1の検出方法における工程(B)では、上記工程(A)においてハイブリダイズした断片間に生じた不適正塩基対に、不適正塩基対に特異的に結合する物質であって、標識された物質を結合させる工程である。

基板に固定された断片と変異を検定すべき断片は、この断片の塩基配列と相同性の高い塩基配列を有する基板に固定された断片とハイブリダイズする。そして、変異を検定すべき断片に塩基置換(変異)が存在すると、ハイブリダイズした断片間に不適正塩基対が生じる。

工程(B)では、この不適正塩基対に、不適正塩基対に特異的に結合する物質であって、標識された物質を結合させる。「不適正塩基対に特異的に結合する物質」は、例えば、ミスマッチ結合タンパク質を挙げることができる。さらに、ミスマッチ結合タンパク質としては、Mut Sまたはその類似体を例示することができる。Mut Sは大腸菌の複製ミス修復する一群のタンパク質の一つであり、不適正塩基対の部分の特異的に認識して結合する。

【0012】

さらに、上記不適正塩基対に特異的に結合する物質は、例えば、発光タンパク質、リン光タンパク質、蛍光タンパク質、発光物質、蛍光物質、リン光物質、安定同位元素、放射性物質、抗体、抗原、酵素及びタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも1種の物質で標識される。発光タンパク質としては、例えば、GFP (Green Fluorescence Protein)を挙げることができる。抗体としては、抗Mut S抗体を挙げることができる。また、抗原(タグ)としては、His タグ、チオレドキシントグ、HAタグ、mycタグ等を挙げることができる。尚、チオレドキシントグに大しては、抗チオレドキシントグ抗体を用い、HAタグ、mycタグに対しては抗myc抗体を用いることができる。また、タンパク質としてビオチンを挙げることも

できる。さらに、酵素としては、アルカリフォスファターゼ、ルシフェラーゼ、エコーリン等を挙げることが出来る。

また、標識の付し方は、標識の種類に応じて適宜選択でき、例えば、標識物質が、発光タンパク質、リン光タンパク質、蛍光タンパク質、酵素及びタンパク質等の場合、細胞融合法を用いることができる。また、標識物質が、蛍光物質、リン光物質、安定同位元素、放射性物質、抗体及び抗原の場合、公知の化学反応又は酵素反応を用いて標識の付すことができる。

発光タンパクであるGreen Fluorescence Protein (GFP)はいかなる補助物質も必要とせず、このタンパク単独でATPを消費して発光する物質である。比較的大きな25 KDaの分子量を持つタンパクであるが、Mut Sの遺伝子とアミノ酸のコドンに合わせて融合タンパク質を作製し、発光現象を用いて不適正塩基対を検出することができる。本融合タンパク質は不適正塩基対部位を検出するのに非常に有用でマイクロチップ上で使用する用途に限定されるものではない。

尚、本発明は、上記「不適正塩基対に特異的に結合する物質であって、標識された物質」を包含する。

【0013】

工程 (C)

本発明の第1の検出方法における工程 (C) では、前記標識を有する物質が結合した断片を、前記標識を検出することにより同定する。標識の検出は、標識の種類により適宜選択できる。例えば、発光タンパク質、リン光タンパク質、蛍光タンパク質、発光物質、蛍光物質、リン光物質等で標識した場合、発光、蛍光、またはリン光を、適当な検出器により検出する。また、安定同位元素、放射性物質で標識した場合には、放射線量を適宜検出することができる。抗体または抗原で標識した場合、抗原または抗体を用いて検出する。タンパク質としてビオチンを用いた場合、ビジンを用いて検出することができる。さらに、酵素で標識した場合、適当な基質を選択することで、反応生成物として発光性の物質を生成させることができる。基質としては、例えば、アルカリフォスファターゼの場合、適当な化学発光基（例えば、塩素置換1,2-dioxetane）を有する化学発光基質を挙げることができ、ルシフェラーゼの場合、ルシフェリンを挙げることができる。

本発明の第1の検出方法においては、不適正塩基対に特異的に結合する物質が結合した断片を、その標識を検出することにより、不適正塩基対を生じた断片を同定することができる。

【0014】

さらに本発明の第1の検出方法においては、変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片にも標識を導入し、かつ変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片の標識を検出することにより、不適正塩基対を生じた断片の同定に加えて定量も行うことができる。

変異を検定すべき核酸及び／又はPNAに対する標識は、例えば、発光物質、蛍光物質、リン光物質、安定同位元素、放射性物質、抗体、抗原、酵素及びタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも1種の物質で行うことができる。その具体例は、前記不適正塩基対に特異的に結合する物質の説明で挙げたものと同様である。

【0015】

さらに、変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片に導入された標識を、不適正塩基対に特異的に結合する物質の標識とは、得られるシグナルが異なる物質とすることにより、不適正塩基対を生じた断片の同定と定量とを並行して行うことができる。即ち、並行して得られる変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片の発現量の結果、及び不適正塩基対を生じた断片の同定及び定量結果から、ハイブリダイズした断片中に含まれる不適正塩基対分子の比率を算出することができる。より具体的には、変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片に導入された標識から得られるシグナル等の強度（例えば、発光強度等）と不適正塩基対に特異的に結合する物質に導入された標識から得られるシグナル等の強度（例えば、発光強度等）を測定し、それぞれ、予め作成しておいた検量線等と対比することにより、変異を検定すべき核酸が遺伝子であればその発現量と、不適正塩基対を生じた断片の比率を定量することができる。

基板上で形成されたハイブリッド分子の不適正塩基対をプローブと別の物質により標識された不適正塩基対と特異的に結合する物質により検出する。例えば、GFPを用いてMutSを標識し、それとは異なる蛍光物質で蛍光物質でプローブを標

識した理由は、非励起下においてのシグナルはMutSのシグナルであり、レーザーで励起時のシグナルはプローブを標識したシグナル蛍光とGFPの発光シグナルの総和であり、また、蛍光物質の蛍光波長域がGFPの可視光線域と異なる場合には、分光によりその強度比を得ることができる。

【0016】

不適正塩基対のシグナルの強さは測定すべきcDNA（転写物）の全体における発現頻度により変化する。しかし、本発明の方法では発現量の計測と同時に不適正塩基対のシグナルを同一基板上で測定できるため、その比を取ることでより確実に塩基の点変異を検出することができる。

特に基板上に固定した完全長cDNAの場合には、その遺伝子における変異が転写単位のいかなる部位にあっても検出することができるため、表現形質を支配する原因遺伝子の探索やガンにおける変異を検出するのに極めて有効な方法である。また、この不適正塩基対の情報を高等動植物の家系を解析し、各遺伝子の伝達を解析した場合、遺伝子の塩基配列上の多型（原因遺伝子の突然変異も含む）を用いて、連鎖解析を行なうことができるため極めて有効である。

【0017】

工程（D）

本発明の第2の検出方法における工程（D）では、ハイブリダイズした断片間に生じた不適正塩基対に、不適正塩基対を特異的に認識切断する物質を作用させて、不適正塩基対を起点としてハイブリッドした断片を切断するか、または不適正塩基対を起点としてハイブリッドした断片の一方の断片の少なくとも一部を切除する。不適正塩基対を特異的に認識切断する物質としては、例えば、ヌクレアーゼを挙げることができる。また、ヌクレアーゼとしては、Mung beanヌクレアーゼ、S1ヌクレアーゼ、RNase I等を例示することができる。

【0018】

不適正塩基対の検出時に検出すべき不適正塩基対の種類により、検出物質を選択する必要がある。例えば、前記MutSは点変異等の不適正塩基対を検出し易いが、欠失、挿入がある場合、結合せず見落とす場合が多い。また点変異においても不適正塩基対の組み合わせにより検出感度が変わる場合がある。例えば、MutSの

場合GTミスマッチやGAミスマッチなどは検出し易いが、特にCCミスマッチは結合アフィニティーが弱く、見落とす可能性がある。

そこで、本発明の第2の検出方法においては、工程(D)で、ハイブリダイズした断片間に生じた不適正塩基対に、不適正塩基対を特異的に認識切断する物質を作用させて、不適正塩基対を起点としてハイブリッドした断片を切断し、工程(E)で切断または切除後に基板上に残った断片を標識する方法と採用する。

Mung beanヌクレアーゼ、S1ヌクレアーゼ、RNase I等の不適正塩基対を切断する酵素を用いて、切断または切除した後に標識することで、欠失や挿入等の変異に起因する不適正塩基対がある場合でも検出することができるという利点がある。

【0019】

工程(E)

本発明の第2の検出方法の工程(E)では、工程(D)で切断または切除後に基板上に残った断片を標識する。工程(E)における、断片の標識は、例えば、標識された基質を用いた酵素反応により行うことができる。酵素反応としては、ポリメラーゼ反応、カイネーション反応、ライゲーション反応、または3付加反応を用いることができる。さらに、酵素反応として3付加反応を用いる場合、基板上に固定された断片の3末端は、基板上に固定する前、ハイブリダイゼーション前、またはハイブリダイゼーション後、標識の付加前に、ブロックしておくことが、切断または切除された断片にのみ3付加反応により標識を選択的に導入するという観点から適当である。上記ブロックは、例えば、末端にターミナルトランスフェラーゼ等を用いてジデオキシヌクレオチドを導入することにより行うことができる。

酵素反応に用いられる基質の標識物質としては、例えば、発光物質、蛍光物質、リン光物質、安定同位元素、放射性物質、抗体、抗原、酵素及びタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも1種の物質を挙げることができる。その具体例は、前記不適正塩基対に特異的に結合する物質の説明で挙げたものと同様である。

【0020】

工程（F）

本発明の第2の検出方法の工程（F）では、標識された断片を、前記標識を検出することにより同定する。標識の検出は、標識の種類により適宜選択でき、その具体例は、本発明の第1の検出方法の工程（C）で説明したものと同様の手法を用いることができる。

本発明の第2の検出方法においては、工程（E）においてなされた標識を検出することにより、不適正塩基対を生じた断片を同定することができる。

【0021】

さらに本発明の第2の検出方法においては、変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片にも標識を導入し、かつ変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片の標識を検出することにより、不適正塩基対を生じた断片の同定に加えて定量も行うことができる。

変異を検定すべき核酸及び／又はPNAに対する標識は、例えば、発光物質、蛍光物質、リン光物質、安定同位元素、放射性物質、抗体、抗原、酵素及びタンパク質からなる群から選ばれる少なくとも1種の物質で行うことができる。その具体例は、前記不適正塩基対に特異的に結合する物質の説明で挙げたものと同様である。

さらに、変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片に導入された標識を、工程（E）において断片に付与される標識とは、得られるシグナルが異なる物質で行うことにより、不適正塩基対を生じた断片の同定と定量とを並行して行うことができる。即ち、並行して得られる変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片の発現量の結果、及び不適正塩基対を生じた断片の同定及び定量結果から、ハイブリダイズした断片中に含まれる不適正塩基対分子の比率を算出することができる。より具体的には、変異を検定すべき核酸及び／又はPNAの断片に導入された標識から得られるシグナル等の強度（例えば、発光強度等）と工程（E）において断片に付与される標識から得られるシグナル等の強度（例えば、発光強度等）を測定し、それぞれ、予め作成しておいた検量線等と対比することにより、変異を検定すべき核酸が遺伝子であればその発現量と、不適正塩基対を生じた断片の比率を定量することができる。

【0022】

【発明の効果】

本発明によれば、蓄積されつつあるゲノム情報、ゲノムクローンの資源を利用して、複数の遺伝子の構造変異を並行して検出可能な方法、特に、発現量を同時にモニターしながら、その構造変異を検出することができる新規な方法を提供することができる。さらに、本発明の方法によれば、発現量のモニターとその構造変異（塩基置換）を同時に検出することが可能であることにより、既知のゲノム情報を利用して、どの遺伝子に構造変異（塩基置換）が起きているかを迅速に判定することが出来る。

さらに本発明は、上記方法に有用な不適正塩基対に特異的に結合する物質であって、標識されている物質、及び基板の表面にRNA断片又はPNA断片をハイブリダイゼーション可能な状態で固定した物品も提供する。

【0023】

本発明の方法によれば、発現の頻度情報と多型もしくは変異による不適正塩基対の情報が同一基板上で得られるという利点がある。

さらに、本発明の方法を利用すると、複数の個体に由来する複数の遺伝子中に存在する不適正塩基対を検出することにより、生物の家系について連鎖解析を行なうことができる。また、同一の発現形質を有する複数の個体に由来する複数の遺伝子の混合物の不適正塩基対を検出して、最も不適正塩基対を生じる遺伝子配列を特定することにより、前記発現形質の原因となる遺伝子配列を探索することもできる。

【0024】

【実施例】

以下、実施例により、本発明を更に詳しく説明する。

実施例 1

固定化するDNAは10マイクログラムのTSH β ダブルストランドcDNAを、クローニングサイトSstI,NotIで切断し、620bpのインサートDNAをBluescriptIIと0.8%アガロース電気泳動で切り出した。このDNAに2'3'-ジデオキシ5(アミノメチルエチニル)UTPを基質に、ターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラ

ーゼを1xTdT バッファーと反応させ、エタノールで沈殿回収する。これにより、3'末端にアミノ基を導入できた。

一方、スライドガラスを100% トリフルオロ アセテート(TFA)で室温1時間処理し、乾燥させた。その後、2%APTES(Aminopropyltriethoxy silane)の水：アセトン (50:50)溶液に浸して、1日室温に放置する。アセトンで3回洗浄後、最後にアセトニトリルで洗浄して乾燥させた。前記アミノ基を導入した0.5マイクログラムDNAに無水こはく酸を添加し、3'末端にカルボキシル基を導入する。このDNA液に1/10量の5% 水溶性カルボジイミドを加え、すぐにドットする。これを50度6時間インキュベート後、ガラスを10mMTris, 1mMEDTA, 0.1%SDSで洗浄する。このスライドガラスを0.1N NaOHで洗浄後、10mMTris Cl, 1mMEDTAでアルカリを洗い流し中和することにより、一本鎖DNAをスライドガラスに固定化した。

【0025】

実施例 2

MutS-GFP融合タンパク質発現プラスミドの構築を図1に示す。

まず、大腸菌DH5 α のMutS遺伝子をPCRで増幅した。上流プライマーには、開始コドン周辺の配列を変形し、XhoI部位を持たせたttg gta ctc gag atg agt gca at a gaa aat ttc gac、下流プライマーにはAccI部位を持たせるように変形したcga cgt tgt cga cac cag gct ctt caa gcg ata aatを用いた。増幅したDNAフラグメントはXhoI、AccIで消化した後、pEGFP-N1(CLONETECH社製)に連結し、MutS-GFPとし、DH10 α に導入して増殖させた。

次に、DH10 α から回収したMutS-GFPをNotI, XhoIで消化して、pThioHisB (Invitrogen社製)のNotI, XhoIに連結し、HP-Thio-MutS-GFPを構築した。

これを発現用宿主大腸菌TOP10(Invitrogen社製)に導入し、LB培地中25度で培養し、IPTGを加えて、融合タンパク質の発現を誘導し、培養した後集菌した。この菌体を超音波破碎し、10000gで遠心した上清を可溶性画分とした。

この可溶性画分を抗チオレドキシン抗体を用いたウェスタンブロッティングにかけたところ十分量の融合タンパク質が発現していることが確認できた。

得られた可溶性画分をProBond カラム(Invitrogen社製)を用いて同社のプロトコールに従って精製し、精製物をエンテロキナーゼで処理によりHPチオレドキシン

ン部分とMutS-GFP部分を切り離した。これをSDS電気泳動にかけ、130kDaのバンドを切り出し、さらにリナチュレーションしてMutS-GFP融合タンパク質とした。

【0026】

実施例3

実施例1で作製したDNAチップを、非特異的ハイブリダイゼーションを無くするため、70mM無水コハク酸、0.1Mほう酸、pH8.0、35% 1-メチル-2-ピロリジノン溶液で処理した。³²PでラベルしたTSHβダブルストランドcDNA0.1マイクログラムを4マイクログラムpoly(dA)+DNA、2.5マイクログラム大腸菌tRNA、4マイクログラムマウスCotI DNA、0.3マイクロリットル10%SDSを含んだ11マイクロリットル3.5xSSCに溶解し、2分間煮沸させた後室温で冷ました。ハイブリダイゼーションは62℃の温水浴中で14時間行った。終了後、2xSSC、0.2%SDSで5分間、0.2xSSCで1分間洗浄した。これに実施例2で調整したMutS-GFP融合タンパク質1ナノモル、0.02M KPO4, pH7.4, 0.05MKCl, 0.1mM EDTA, 1mMジチオスレイトール, 0.01%BSAを反応させ、37度で1時間インキュベートした。0.02M KPO4, pH7.4, 0.05MKCl, 0.1mM EDTA, 1mMジチオスレイトール, 0.01%BSAで洗浄後、蛍光顕微鏡下でMutS-GFP融合タンパク質が結合しているかどうか判定した。その後、DNAチップのオートラジオグラフィーをとり、ラベルしたcDNAがハイブリダイゼーションしているかどうかの判定を行った。結果を図2に示す。

【図面の簡単な説明】

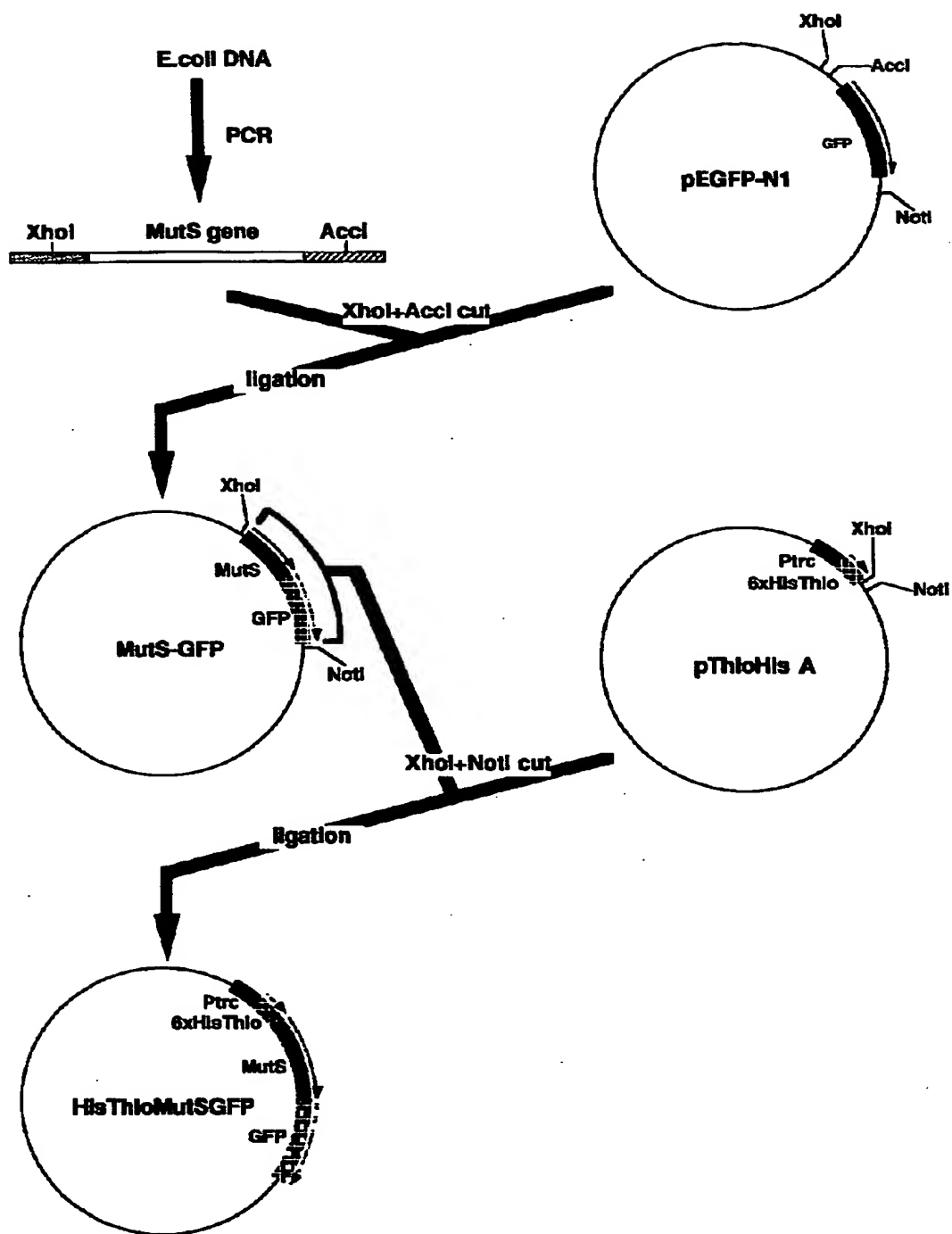
【図1】 MutS-GFP 融合タンパク質・発現プラスミドの構築法を示す。

【図2】 実施例3で得られたDNAチップのオートラジオグラフィーの結果を示す。

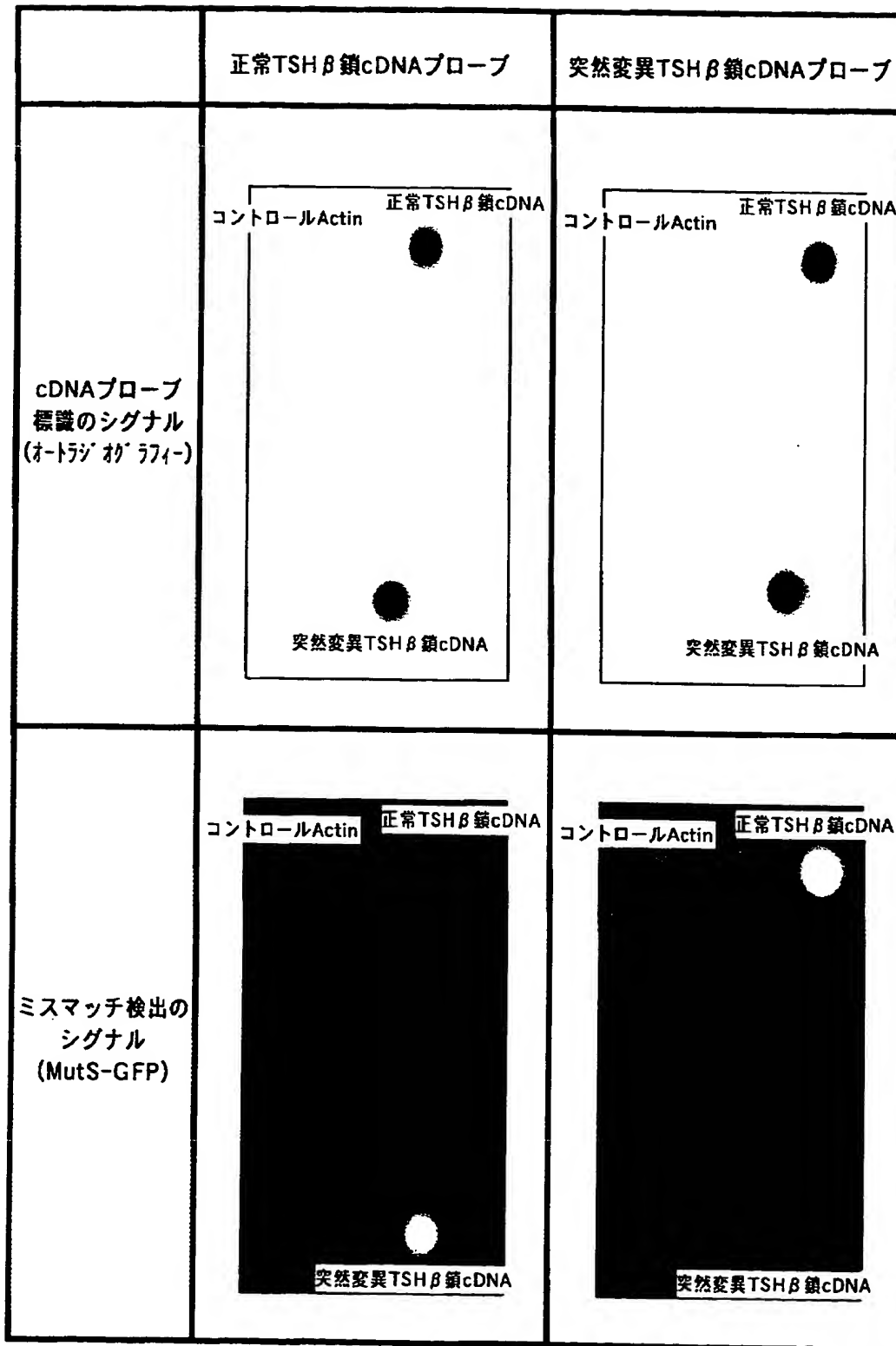
【書類名】

図面

【図 1】



【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 複数の遺伝子の構造変異を並行して検出可能な方法、特に、発現量を同時にモニターしながら、その構造変異を検出可能な方法の提供。

【解決手段】 核酸断片等を固定した基板上の前記断片と、変異を検定すべき核酸断片等とをハイブリダイズさせて生じた不適正塩基対に、標識されたMut Sのような不適正塩基対に特異的に結合する物質を結合させ、前記物質が結合した断片を検出することにより同定する、変異を有する核酸及び／又はPNA断片を検出する方法。不適正塩基対に特異的に結合する物質の代わりに、ハイブリダイズした断片間に生じた不適正塩基対に、不適正塩基対を特異的に認識切断する物質を作用させて、不適正塩基対を起点としてハイブリッドした断片を切断または切除し、切断または切除後に基板上に残った断片を標識し、標識された断片を検出することにより同定することもできる。GFP標識されているMut Sのような不適正塩基対に特異的に結合する物質。

【選択図】 図2

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000006792

【住所又は居所】

埼玉県和光市広沢2番1号

【氏名又は名称】

理化学研究所

【代理人】

申請人

【識別番号】

100092635

【住所又は居所】

東京都中央区八重洲1丁目8-12 藤和八重洲一丁目ビル7F

【氏名又は名称】

塩澤 寿夫

【選任した代理人】

【識別番号】

100096219

【住所又は居所】

東京都中央区八重洲1丁目8番12号 藤和八重洲一丁目ビル7階

【氏名又は名称】

今村 正純

【選任した代理人】

【識別番号】

100095843

【住所又は居所】

東京都中央区八重洲一丁目8番12号 藤和八重洲一丁目ビル7階

【氏名又は名称】

釜田 淳爾

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名	理化学研究所